



دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد ایمنی شناسی

عنوان:

بررسی تاثیر پیوند اتولوگ سلول های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با اینترفرون-  
گاما بر بیان کموکاین ها و گیرنده های کموکاینی مرتبط TH1، TH2، TH17 و Treg  
در انسفالومیلیت خود ایمن تجربی (EAE) در مدل حیوانی موش C57BL/6

توسط: رضا احمدی فرد

استاد راهنما: دکتر عبدالله جعفرزاده

سال تحصیلی: ۱۳۹۸-۱۳۹۹

## چکیده

**مقدمه:** مالتیپل اسکلروزیس (MS)، یک بیماری مزمن سیستم عصبی مرکزی می باشد. در این بیماری، سلول هایی شامل سلول های T اتوراکتیو و ماکروفاژها با حملات خود، ارتباط بین نورون ها را مختل می کنند. انسفالومیلیت خود ایمن تجربی (EAE)، به عنوان یک مدل حیوانی، برای بیماری MS در نظر گرفته می شود. پیوند سلول های بنیادی از جمله سلول های بنیادی مزانشیمی (MSCs)، درمان MS را ارتقا و بهبود بخشیده است. MSCs، قابلیت سرکوب کنندگی ایمنی قابل ملاحظه ای دارند. به علاوه می توانند از نورون ها و آکسون ها نیز حفاظت کنند.  $IFN-\gamma$ ، می تواند MSCs در حالت استراحت را فعال کرده و منجر به افزایش پتانسیل سرکوب کنندگی ایمنی آن ها گردد. MSCs فعال شده با  $IFN-\gamma$  با ترشح مقادیر زیادی از کموکاین ها، سلول های T را جذب کرده و از تکثیر آن ها و تولید سایتوکاین های التهابی جلوگیری می کنند.

**روش ها:** سلول های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی موش های C57BL/6 استخراج و کشت داده شدند. سپس تمایز این سلول ها به سلول های استخوانی و چربی صورت گرفت و این سلول ها از نظر ماکر های سطح سلولی توسط فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از القای EAE، اندازه گیری شدت بیماری و وزن موش ها به صورت روزانه انجام شد. AD-MSCs با  $IFN-\gamma$  تیمار شدند. پس از بروز اولین علائم بالینی بیماری، سلول ها به موش ها پیوند زده شدند. پس از ۲۰ روز از پیوند سلول ها، میزان بیان ژن های مورد نظر با تکنیک Real-Time PCR و میزان ارتشاح لکوسیته CNS با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین بررسی شد. آنالیز های آماری نیز با نرم افزارهای SPSS و GraphPad Prism انجام گرفت.

**یافته ها:** پیوند سلول های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با  $IFN-\gamma$ ، شدت علائم بالینی EAE را تخفیف داد، وزن موش های مبتلا به EAE را بهبود بخشید، ارتشاح لکوسیته را در مغز موش های مبتلا به EAE کم کرد و میزان بیان کموکاین های التهاب آور کاهش داد و همچنین میزان بیان کموکاین های ضد التهابی را در EAE افزایش داد. همچنین قدرت و پتانسیل تعدیل ایمنی این سلول ها در حضور سایتوکاین  $IFN-\gamma$ ، افزایش یافت.

**بحث و نتیجه گیری:** AD-MSCs تیمار شده با  $IFN-\gamma$  از طریق افزایش بیان IDO، سبب تعدیل ایمنی و سرکوب تکثیر سلول های T می گردند. همچنین این سلول ها بوسیله شیفت تعادل به سمت سلول های  $Th2$ ، سبب مهار تمایز

سلول های Th17، می گردند. به علاوه MSCs توانایی تولید Treg، را داشته و با تولید IL-10 و تغییرات اپی ژنتیک سبب افزایش تمایز Treg می شوند. در نتیجه این سلول ها هم به عنوان تعدیل کننده سیستم ایمنی و هم به عنوان سلول هایی با قابلیت تمایز به سلول های عصبی، می توانند در طراحی پروتکل های درمانی به منظور درمان بیماری MS، مورد بررسی بیشتر و استفاده قرار گیرند.

**کلمات کلیدی:** سلول های بنیادی مزانشیمی، MS، EAE، اینترفرون-گاما، موش C57BL/6

## **Abstract:**

**Background and Aims:** Multiple Sclerosis (MS) is a chronic disease of the central nervous system. In this disease, cells that contain autoreactive T-cells and macrophages with their own attacks disturb the association of neurons. Experimental Auto-immune encephalomyelitis (EAE), as an animal model, is considered for MS. Stem cell transplantation, including Mesenchymal Stem Cells (MSCs), has improved and improved MS treatment. MSCs have significant immunosuppressive capabilities. In addition, they can protect neurons and axons. IFN- $\gamma$  can activate MSCs in resting position and increase their immune suppression potentials. Activating MSCs with IFN- $\gamma$ , by secreting large amounts of chemokines, absorbs T cells and prevents them from proliferating and producing inflammatory cytokines.

**Material and Methods:** Mesenchymal stem cells were extracted from adipose tissue of C57BL/6 mice and cultured. The differentiation of these cells into osteogenesis and adipogenesis cells was performed and the cells were evaluated by flow cytometry for cell surface markers. After induction of EAE, the severity of the disease and the weight of the mice were measured daily. AD-MSCs were treated with IFN- $\gamma$ . After the first clinical symptoms of the disease, the cells were grafted to the mice. After 20 days of cell transplantation, the expression of the genes was investigated using Real-Time PCR technique and leukocyte infiltration of CNS by staining with hematoxylin and eosin. Statistical analyzes were performed with SPSS and GraphPad Prism software.

**Results:** The transfusion of IFN- $\gamma$  treated mesenchymal stem cells reduced the severity of EAE clinical symptoms, improved the weight of EAE mice, reduced leukocyte infiltration in the brain of EAE mice, and decreased expression of inflammatory chemokines And increased the expression of anti-inflammatory chemokines in the EAE. The strength and potential of immune modulation of these cells in the presence of IFN- $\gamma$  cytokines also increased.

**Conclusions:** AD-MSCs treated with IFN- $\gamma$ , by increasing the expression of IDO, modulate the immunity and suppress the proliferation of T cells. These cells also suppress Th17 cells, by shifting the balance to Th2 cells. In addition, MSCs have the ability to produce Treg, and with the production of IL-10 and epigenetic changes, they increase the Treg differentiation. As a result, these cells, both as immunostimulators and as cells that can be differentiated into neurons, can be further explored and used in the design of therapeutic protocols for the treatment of MS.

**Keywords:** Mesenchymal Stem Cells, MS, EAE, Interferon-Gamma, C57BL/6 Mic



**Kerman University of Medical Sciences**

**Faculty of Medicine**

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree MSc Immunology

**Title:**

**The effect of transplantation of mesenchymal stem cells treated with IFN- $\gamma$  on expression of chemokines and chemokine receptor of TH1, TH2, TH17 and Treg cells in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)**

**By:**

**Reza Ahmadifard**

**Supervisor:**

**Dr. Abdullah Jaffarzadeh**

**Year:**

**2019**

